

Produksi dan Uji Spesifitas Antibodi Monoklonal Terhadap bZP3 Terdeglikosilasi (Mab-bZP3dG) Untuk Pengembangan Imunokontrasepsi Wanita

Production and Specificity testing of Monoclonal Antibodies to *Bovine Zonna Pellucida* 3 Deglycosylated (Mab-bZP3dG) for Woman Immunocontraceptive Vaccine

Sutiman B. Sumitro¹, Aulanni'am², Ciptadi. G³, Soewarto. S⁴

¹ Biomolecular Laboratory, Biology Departmen,

² Biochemistry Laboratory, Chemistry Department , Faculty of Mathematic and Natural Sciences,

³ Central Labolatory Of Life Sciences,

⁴ Departmen of obstetric and ginecology, RSSA, Brawijaya University

Email : Sutiman@brawijaya.ac.id

Abstract

Immunocontraception has received increased interest in last decades as a potential way of controlling the rapid growth of Indonesian population. Development of vaccine based on zona pellucida antigens represents a promising approach to potential contraception. Recent advances in monoclonal antibody technology are enabling the development of new methods for producing specifif antibody for immunocontraception. Seven research stages were conducted to construct monoclonal antibodies to *Bovine Zonna Pellucida* 3 Deglycosylated (MAB-bZP3dG). Stage 1, collection *Bovine Zonna Pellucida* 3 Deglycosylated (bZP3dG), stage II, Immunisized mouse Balb/c by *Bovine Zonna Pellucida* 3 Deglycosylated (bZP3dG), stage III, Collecting spleen cells from a mouse that has been immunized with the desired antigen, stage IV Fussion spleen cells with myeloma cells, stage V, Hybridoma screening , stage VI, single cell cloning and Monoclonal antibody production and characterization. The Result showed that MAB-bZP3dG were produced both hybridoma cell and ascites fluid positively and more specific reacted with antigen *Bovine Zonna Pellucida* 3 Deglycosylated (bZP3dG) by immunoblotting technique. MAB-bZP3dG should prove useful for candidate immunocontraceptive vaccine.

Keywords : *Bovine Zonna Pellucida* 3 Deglycosylated (bZP3dG), immunocontraception, Monoclonal antibody

Pendahuluan

Proses pengenalan spermatozoa dengan permukaan oosit (zona pelusida) pada proses fertilisasi merupakan suatu hal yang sangat potensial untuk diteliti dan dikembangkan sebagai vaksin kontrasepsi. Zonna Pellusida memfasilitasi interaksi antara sel telur dan spermatozoa pada proses fertilisasi kelompok mamalia (Tulsiani, 2000; Peterson *et al.*, 2000 dan Sumitro 2001). Menurut Aulanni'am dan Sumitro (2001) molekul bZP3 telah dibuktikan merupakan molekul glikoprotein yang terglisosilasi melalui “*N-Linked oligosaccharide* dan “*O-Linked oligosaccharide* “. Zona pellucida sapi terbagai atas 4 bagian yaitu (bZP1, bZP2, bZP3, dan bZP4). *Bovine zona pellucida-3 (bZP3)*, merupakan reseptor primer spermatozoa dimana bZP3 memiliki berbagai tingkat glikosilasi dengan populasi karbohidrat yang sangat heterogen yang terikat pada asam amino serin, threonin atau asparagin (Tulsiani, 2000).

Pada tahap awal fertilisasi sperma terikat pada rantai karbohidrat glikoprotein ZP3 secara spesifik. Namun, dari penelitian lain menjelaskan bahwa antibodi bereaksi sangat lemah dengan glikosilasi dari ZP3, tetapi reaktivitas ini dapat ditingkatkan dengan meningkatkan kualitas protein

sebagai antigen melalui penghilangan gugus karbohidrat (deglycosylated) (Tulsiani, 2000). Antibodi poliklonal bZP3dG terbukti menghambat fertilisasi secara *in vivo*, namun belum memiliki spesifitas yang cukup baik sehingga dalam studi ini menjadi sangat penting untuk meningkatkan kualitas antibodi dengan memproduksi antibodi monoklonal terhadap bZP3dG (Mab-bZP3dG).

Materi dan Metode Penelitian

Untuk mendapatkan kualitas yang baik dari bZP3dG dilakukan isolasi membrane zona pellucida secara mekanik. Selanjutnya dilakukan SDS PAGE dan dilakukan elektroelusi bZP3, selanjutnya dilakukan deglikosilasi secara enzimatis menggunakan *N-glycanase*. Zonna Pellucida 3 Deglycosylated (bZP3dG) dijadikan sebagai antigen dan diimunisasikan pada mencit secara intraperitoneal. Setelah 3 minggu diisolasi sel limfosit yang berasal dari spleen. Hasil sel limfosit selanjutnya difusikan dengan sel myeloma dengan menggunakan PEG (*Poly Etylen Glycol*). Setelah dilakukan fusi ditumbuhkan pada plate kultur yang sudah ditumbuhkan *Feeder layer* berupa sel makrofag. Penumbuhan sel yang berfusi dilakukan dalam medium RPMI yang ditambah medium HAT.

Setelah itu sel yang sudah fusi dan tumbuh dilakukan seleksi klon dari hybridoma. Sel klon dideteksi dengan menggunakan ELISA setelah itu dipanen medium yang mengandung antibodi Monoklonal *bZP3dG* (*Mab-bZP3dG*). Tahap selanjutnya dilakukan karakterisasi dan uji spesifitas dengan menggunakan metode Dot Blotting dan western Blotting.

Dot Blotting

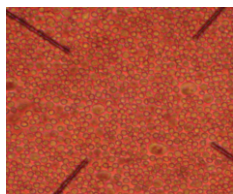
Protein *bZP3dG* diencerkan dengan PBS-azida 1% dan ditetaskan pada membran nitroselulosa selanjutnya *diblocking* dengan PBS *skim milk* 5% selama satu jam membran dicuci 3 kali dengan PBS Tween20 0.05%. Inkubasi antibodi monoklonal (*Mab-bZP3dG*) yang tdienkerkan dalam PBS *skim milk* 1% selama 2 jam, dicuci 3 kali dengan PBS tween20 0.05%. Diinkubasi kembali dengan antibodi sekunder (*Anti Mice IgG Conjugate AP*) selama 1 jam. Kemudian ditambah substrat *western blue* selama 30 menit dalam ruang gelap. Membran dikeringkan dan diamati *blot* yang terbentuk.

Western Blotting

Isolat *bZP3dG* dilakukan running SDS-PAGE 12% dan selanjutnya ditransfer pada membrane *Nitro cellulose* (NC) dan direaksikan dengan *Mab-bZP3dG* dan anti-mouse-IgG-AP. Pada Tahap terakhir ditambahkan substrat western blue, Hasil rekasi positif apabila terdapat pita biru yang merupakan hasil reaksi *bZP3dG* dengan Monoklonal antibodi *bZP3dG* (Aulanni'am, 2005).

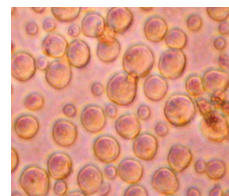
Hasil dan Pembahasan

Isolat *bZP3dG* digunakan sebagai antigen yang diimunisasikan pada mencit Balb/c untuk mendapatkan sel limfosit B yang mengekspresikan anti terhadap *bZP3dG* (Gambar 1).



Gambar 1. Limfosit B Yang Diisolasi Dari Limpa Mencit Balb/c

Sel limfosit B dan sel myeloma selanjutnya difusikan dengan menggunakan PEG dan ditumbuhkan pada medium HAT dimana sel yang berhasil fusi membentuk Hibridoma akan tetap hidup sedangkan yang tidak fusi akan mati (Gambar 2).



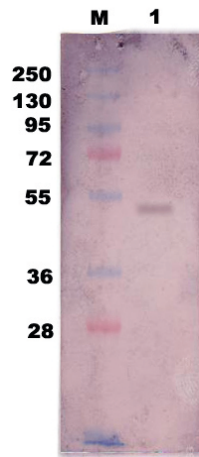
Gambar 2. Hibridoma Selektif Terhadap HAT

Sel hibridoma yang berhasil fusi kemudian dilakukan seleksi klon untuk mendapatkan sel yang mengekspresikan antibodi terhadap *bZP3dG*. Antibodi monoklonal yang didapatkan selanjutnya dilakukan uji spesifitas dengan metode *Dot blotting*. Hasil uji *Dot blotting* memperlihatkan adanya gradasi warna noda yang terbentuk sebagai hasil reaksi antara *Mab-bZP3dG* dengan isolat *bZP3dG*, hal ini dipengaruhi oleh adanya variasi pengenceran *Mab-bZP3dG*. *Mab-bZP3dG* mampu mengenali *bZP3dG* sampai pada pengenceran 1:5000 yang mengindikasikan antibodi monoklonal yang diproduksi memiliki spesifitas yang cukup tinggi (Gambar 3).

Pengenceran Anti- <i>bZP3dG</i>	<i>bZP3dG</i>
K	
1:50	
1:100	
1:250	
1:500	
1:1000	
1:1500	
1:2000	
1:2500	
1:5000	

Gambar 3. Uji spesifitas Antibodi Monoklonal Terhadap *bZP3dG* (*Mab-bZP3dG*) dengan Metode *Dot blotting*

Hasil uji *Dot blotting* belum memberikan informasi tentang berat molekul protein target, sehingga perlu dilakukan pengujian lanjutan yang lebih spesifik dengan menggunakan metode *Western Blotting*.



Gambar 4. Uji Spesifitas Antibodi Monoklonal (*Mab-bZP3dG*) dengan *Western blotting*

Uji *dot blotting* menunjukkan adanya antibodi monoklonal terhadap *bZP3dG* (*Mab-bZP3dG*) yang dihasilkan dari sel hibridoma mampu berikatan dengan *bZP3dG*. Hal ini belum sepenuhnya menunjukkan tingkat spesifitas dari *Mab-bZP3dG* sehingga perlu dilakukan konfirmasi untuk melihat apakah *Mab-bZP3dG* dapat mengenali isolat *bZP3dG* secara spesifik menggunakan metode *Western Blotting*. *Mab-bZP3dG* yang dihasilkan cairan ascites mampu mengenali *bZP3dG* pada berat molekul $50,462 \pm 0,004$ kDa. Hal ini membuktikan bahwa *Mab-bZP3dG* yang telah diproduksi pada penelitian ini bersifat spesifik karena hanya mengenali *bZP3dG* bukan molekul zona pellusida lainnya.

Spesifitas antibodi ditentukan oleh jumlah epitop yang dapat terikat semakin sedikit jumlah epitop yang dapat dikenali maka spesifitas antibodi akan semakin baik. Antibodi poliklonal memiliki site pengenalan epitop sangat banyak sehingga memiliki spesifitas yang kurang, sedangkan antibodi monoklonal merupakan antibodi yang *monoepitop* dimana antibodi monoklonal hanya akan berikatan dengan satu jenis epitop yang spesifik dan sesuai. Sehingga spesifitas antibodi monoklonal lebih baik jika dibandingkan spesifitas antibodi poliklonal dimana hal ini sangat menguntungkan dalam berbagai aplikasi (Kuby, 2004).

Tingkat spesifitas yang semakin tinggi menurut Goldsby et al., (2000) tidak akan menimbulkan cross reactivity. Antibodi dengan spesifitas yang lebih baik tidak akan bereaksi dengan antigen yang tidak sesuai dengan antibodi tersebut. Semakin baik spesifitas antibodi akan membuat antibodi tidak akan bereaksi dengan protein lain

sehingga hanya akan bereaksi dengan target dalam hal ini adalah molekul *bZP3dG*. Adanya spesifitas dan efektifitas yang semakin baik, maka antibodi monoklonal yang diproduksi harapannya tidak akan menimbulkan efek samping dalam proses aplikasi sebagai imunokontrasepsi.

Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini bahwa antibodi monoklonal terhadap *bZP3dG* yang diproduksi bersifat sangat spesifik dalam mengenali molekul *bZP3dG* dan sangat potensial sebagai pengembangan vaksin imunokontrasepsi.

Daftar Pustaka

- Aulanni'am, Sumitro S.B, M.S.Djati, S.Sutiyoso and G. Ciptadi. 2001. Characterization of Bovine Zona Pellucida. Annual Report of Hibah Bersaing Research. IX/1. FMIPA-Unibraw, Malang.
- Aulanni'am, Sumitro S.B, S.Sutiyoso, T. Susilawati, M.S.Djati, G. Ciptadi and A.Roosdiana. 2001 b. The Bovine Zonna Pellucida : The Ratio of Protein and Carbohydrate The 11th ASEAN Federation of Endocrine Societies Congress, November 7-11, 2001, Denpasar Bali (Poster Presentation)
- Birch J.R, J.Bonnerjea, S. Flatman and S.Vranch. 1995. The production of monoclonal antibodies. In: Monoclonal Antibodies: Principles and Applications J.R. Birch and E.S. Lennox, eds., Wiley Liss, Inc.: New York, NY, . 231-265, ISBN:0-471-05147-0.
- Bog-Hansen T.C. 1995. Separation of monoclonal antibodies from cell-culture supernatants and ascites fluid using thiophilic agarose. Methods in Molecular Biology 45:177-81, ISSN:1064-3745.
- Davis W.C. 1995. Methods in Molecular Biology, Vol. 45. Monoclonal antibody protocols. Humana Press Inc.: Totowa, NJ, USA, 264, ISBN:0-89603-308-2.
- Goldsby R.A, T.J.Kindt and A.Osborne. 2000. Immunology. W. H. Freeman and Company. California. 63-65.
- Kuby J. 2004 . The Anatomy of The Immune System . <http://www.micro.msb.le.ac.uk/index.html>: Infection and immunity.
- Peterson T.E, S.M.Petrounkina and G.M.Hundrise. 2000. Oocyte-Sperm Interaction. *Anim Reprod Sci*, 2 : 60-61, 653-62.

- Sumitro S.B and Aulanni'am. 2001. Antibodies to Bovine Zonna Pellucida-3 (anti-bZP3) Induced Reversible Immunocontraception in Local Rabbit and Wistar Rat : A Candidate For Immunocontraception Vaccine The 11th ASEAN Federation of Endocrine Societies Congress , November 7-11, 2001, Denpasar Bali (Poster Presentation)
- Sumitro S.B. and Aulanni'am, 2001. Zona Pellucida 3 (ZP3) has Proper Biochemical Properties to be Considered as Candidate Antigen for Immunocontraceptive Vaccine. Reprotech. The Indonesian Journal of Reproductive Science and Technology. 1(1) : 51–53
- Sumitro S.B, Aulanni'am and S.Sutiyoso. 2002. Bovine Zona Pellucida (bZP3) : A Candidate For Immunocontraceptive Vaccine. Journal of the ASEAN Federation of Endocrine Societies (JAFES). Vol 20 No.1 (Supplement), 145.
- Tulsiani D.R. 2000. Structural analysis of asparagine-linked glycan units of ZP2 and ZP3 glycoproteins from mouse zona pellucida. Arch Biochem Biophys Oct 15 ; 382(2): 275-83